

ヌクレオチド除去修復遺伝子EROC1の変異および機能解析

著者	林 露子
号	1537
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/21768

氏 名（本籍）	はやし 林	つゆ 露	こ 子
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）		
学 位 記 番 号	医 博 第 1 5 3 7 号		
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻		
学 位 論 文 題 目	ERCC1 mutations in UV-sensitive chinese hamster ovary (CHO) cell lines. （ヌクレオチド除去修復遺伝子 <i>ERCC1</i> の変異お よび機能解析）		
	(主 査)		
論 文 審 査 委 員	教授 土 屋	滋	教授 小 野 哲 也
	教授 野 田 哲 生		

論文内容要旨

ヌクレオチド除去修復は紫外線により生じたピリミジンダイマーや化学物質による DNA 付加物などを修復する機構であり、損傷の認識、損傷の切り出し、新生鎖の合成という3つの段階的な過程からなる。近年 ERCC1 はヌクレオチド除去修復において ERCC4 (XPF) と結合し、損傷の 5' 側を切断するエンドヌクレアーゼ複合体を形成していることが明らかにされた。この複合体は ERCC1 と損傷認識タンパク質である XPA との結合を介して損傷部位へ運ばれる。また ERCC1 および ERCC4 (XPF) 欠損細胞はシスプラチンやマイトマイシン C などのクロスリンク剤に対し、他のヌクレオチド除去修復因子の欠損細胞と比較してはるかに高い感受性を示すという特異な特徴を持つことから、ヌクレオチド除去修復以外の仮想的な DNA クロスリンク修復への関与が示唆されている。

ERCC1 欠損によるヒトの疾患は現在まで報告されておらず、ヒトの ERCC1 欠損細胞を得ることはできない。チャイニーズハムスター卵巣細胞株 (CHO) から樹立された紫外線感受性細胞株は 11 の相補性群に分類されており、このうち相補性群 1 に属する細胞株はヒト *ERCC1* 遺伝子を導入することにより、紫外線感受性が相補されることから ERCC1 欠損細胞株であると推定されてきた。これらの細胞株は哺乳類細胞での ERCC1 の機能を考える上で、非常に貴重な実験材料である。しかしこれまでチャイニーズハムスターの *ERCC1* 遺伝子は単離されておらず、相補性群 1 に属する細胞株の *ERCC1* 遺伝子に実際に変異が存在するのかは明らかになっていなかった。

本研究においては、ERCC1 の機能を理解するためにチャイニーズハムスターの *ERCC1* 遺伝子を単離し、CHO の紫外線感受性細胞株の相補性群 1 に属する細胞株の遺伝子変異の同定を行い、変異とこれらの細胞が示す紫外線感受性、クロスリンク剤感受性との関連を解析することを目的とした。

CHO の野生株である CHO-9 細胞、紫外線感受性細胞株相補性群 1 に属する細胞株である 43-3B 細胞、UV-4 細胞の遺伝子の単離解析により次のような結果を得た。[1] チャイニーズハムスターの *ERCC1* 遺伝子のコード領域は 882 塩基対からなり、293 アミノ酸からなる推定 32.1KDa のタンパク質をコードしていた。単離した *ERCC1* 遺伝子を相補性群 1 の細胞株で発現させると、野生株と同程度に紫外線抵抗性となった。[2] 43-3B 細胞の ERCC1 は 98 番目のバリンがグルタミン酸に置換していた (*ERCC1*^{V98E})。このアミノ酸置換は XPA との結合領域にあり、43-3B 細胞の変異型 ERCC1 は XPA との結合能を失っていた。43-3B 細胞では ERCC1 タンパク質量も減少していたが、ヌクレオチド除去修復欠損の原因はこの量的変化ではなく、XPA

タンパク質と結合できないという質的な異常であった。[3] UV-4 細胞の ERCC1 タンパク質は塩基の挿入によるフレームシフトで 182 番目のアミノ酸が停止コドンに変化しており、ERCC4 (XPF) タンパク質との結合に必要とされる領域を欠失していた。このため、UV-4 細胞の ERCC1 は ERCC4 (XPF) と複合体を形成することができず、結果としてエンドヌクレアーゼとして機能できないと考えられた。

次に ERCC1 の変異解析によって得られた結果を利用して、ERCC1 のヌクレオチド除去修復以外の DNA クロスリンク修復への関与を調べた。43-3B 細胞の変異型 ERCC1 タンパク質 (ERCC1^{V98E}) は *in vitro* では ERCC4 (XPF) と複合体を形成することができた。そこで、*in vivo* でもこの複合体を安定に産生させることが出来れば、ヌクレオチド除去修復機能のみを欠損させた ERCC1 欠損細胞が得られると考えた。その目的のために、フレームシフトによる nonsense 変異のために ERCC1 の機能を大きく欠いている UV-4 細胞を選び、この細胞に ERCC1^{V98E} の強制発現を行った。得られた遺伝子導入細胞株は野生株の 1/2 以上の ERCC1 タンパク質を発現していた。これらの細胞株は紫外線に対しては感受性のままであったが、シスプラチンやマイトマイシン C などのクロスリンク剤に対しては、親株である UV-4 細胞に比べて 2 倍～5 倍抵抗性に変化していた。これらの結果は、クロスリンク剤の作る DNA 損傷の修復経路には既知のヌクレオチド除去修復系と、それ以外の修復経路があり、ERCC1/ERCC4 (XPF) エンドヌクレアーゼ複合体はそのいずれにも働いていることを示している。

審査結果の要旨

ERCC1 は ERCC4 (XPF) と結合してエンドヌクレアーゼ複合体を形成し、ヌクレオチド除去修復において損傷認識タンパク質である XPA との結合を介して損傷部位へ運ばれ、損傷の 5' 側を切断する。ERCC1 および ERCC4 (XPF) 欠損細胞はクロスリンク剤に対し、他のヌクレオチド除去修復因子の欠損細胞と比較してはるかに高い感受性を示すことから、ヌクレオチド除去修復以外の仮想的な DNA クロスリンク修復への関与が示唆されてきた。チャイニーズハムスター卵巣細胞株 (CHO) から樹立された紫外線感受性細胞株のうち相補性群 1 に属する細胞株は、ヒト ERCC1 遺伝子を導入することにより紫外線感受性が相補されることから ERCC1 欠損細胞株であると推定されてきたが、これまでチャイニーズハムスターの ERCC1 遺伝子は単離されておらず、相補性群 1 に属する細胞株の ERCC1 遺伝子に実際に変異が存在するのかは明らかになっていなかった。これらの事柄を背景に本研究では、現在得られている哺乳類としては唯一の ERCC1 欠損細胞株である、チャイニーズハムスター卵巣細胞より樹立された紫外線感受性変異細胞株を用いて研究を行い、以下の結論を得た。(1) チャイニーズハムスターの ERCC1 遺伝子のコード領域は 882 塩基対からなり、293 アミノ酸からなる推定 32.1KDa のタンパク質をコードしていた。ヒト、マウスの ERCC1 のアミノ酸配列との相同性はそれぞれ、83.3%、88.9%であった。(2) 43-3B 細胞の ERCC1 は、98 番目のバリンがグルタミン酸に置換していた。このアミノ酸置換は XPA との結合に必要とされる部位に含まれており、43-3B 細胞の変異型 ERCC1 は ERCC4 (XPF) とは結合することができたが、XPA タンパク質との結合能を失っていた。(3) UV-4 細胞の ERCC1 は塩基の挿入によるフレームシフトで 182 番目のアミノ酸が停止コドンに変化しており、ERCC4 (XPF) との結合に必要な領域を欠損していた。(4) XPF との結合を介してヌクレオチド除去修復へ寄与することができない 43-3B 細胞の変異型 ERCC1 を、機能的な ERCC1 を発現していない UV-4 細胞で強制発現させると、紫外線に対しては感受性のままであったが、シスプラチンやマイトマイシン C などのクロスリンク剤に対しては親株に比べて抵抗性が変化していた。これらの結果から ERCC1/ERCC4 (XPF) エンドヌクレアーゼ複合体がヌクレオチド除去修復非依存性の DNA クロスリンク修復系に関与していることが示唆された。

本研究の目的、方法、及び得られた結果とそれに対する考察は学術論文として適切であり、十分学位に値するものと思われた。